

**ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITA' DI BOLOGNA**

**DOTTORATO DI RICERCA**

**TRAPIANTO DI FEGATO: IMMUNOLOGIA CLINICA  
E DI BASE ED IMMUNODEPRESSIONE**

**XIX CICLO – SETTORE DISCIPLINARE MED 18 CHIRURGIA GENERALE**

**TESI DI DOTTORATO**

***RICERCA DELLA TOLLERANZA CLINICA E  
RECIDIVA DI EPATITE C NEL TRAPIANTO DI FEGATO:  
EFFETTI A LUNGO TERMINE DELL'INDUZIONE CON  
ANTICORPI POLICLONALI ANTI-TIMOCITI.***

**DOTT. NICOLA DE RUVO**

**COORDINATORE DEL CORSO**

**Chiar.mo Prof.**

**ROBERTO BELLUSCI**

**RELATORE**

**Chiar.mo Prof.**

**ROBERTO BELLUSCI**

*Dedico questa Tesi di Dottorato:*

*ai miei Maestri nella Chirurgia e Trapiantologia,  
Prof. Roberto Bellusci, Prof. Antonio D. Pinna, Prof. Giorgio E. Gerunda;*

*alla mia famiglia che ancora è con me, e al ricordo di mia madre e mio fratello;*

*a mia moglie, senza la quale poco nella mia vita, carriera e professione  
sarebbe stato possibile.*

Con questo lavoro, frutto di un'esperienza iniziata ben prima dell'iscrizione al Corso di Dottorato in "Trapianto di fegato: immunologia clinica e di base ed immunodepressione", si è cercato di esplorare la reale efficacia clinica dell'applicazione di alcuni "nuovi" concetti di riduzione dell'immunosoppressione e ricerca della tolleranza clinica (o operativa) sugli effetti a lungo termine generati, in un paziente ricevente un trapianto di fegato, dalla recidiva di HCV post-trapianto. Come è noto, la portata di questo evento clinico nella vita dei trapiantati di fegato con infezione da HCV è, ancora oggi, in assenza di terapie o regimi di profilassi sicuri ed efficaci, in grado di condizionarne, spesso in maniera drammatica, la sopravvivenza dell'organo, del paziente, nonché infine la qualità di vita post-trapianto.

La necessità della immunosoppressione ai fini della prevenzione dei fenomeni di rigetto, acuto o cronico, nei pazienti affetti pre-trapianto da malattie virologiche croniche (HCV, ma anche HIV), unita ad alcune caratteristiche peculiari del virus (genotipo) nonché alle caratteristiche immunologiche proprie del ricevente (fenotipo HLA) creano, nel determinismo delle caratteristiche cliniche della recidiva virale, una sostanziale imprevedibilità degli eventi che porteranno alla comparsa di una recidiva di gravità lieve, moderata o anche grave fino al decesso.

La capacità del sistema immune del ricevente di "accettare" l'organo trapiantato senza necessità di immunosoppressori esogeni – tolleranza – ha costituito il frutto di un trentennio di osservazioni sperimentali e cliniche, principalmente nelle due scuole pionieristiche dei trapianti solidi, quella di Thomas Starzl a Pittsburgh e di Roy Calne a Cambridge. Per vie diverse, Calne nel 1998 e Starzl nel 2001 descrissero separatamente che un regime di induzione pre – o intraoperatoria di condizionamento ("induzione") all'immunosoppressione con efficaci agenti linfocitopenizzanti (anticorpi mono- o policlonali), seguita da una immunosoppressione minima postoperatoria era in grado di provocare uno stato di "donor specific non-reactivity", ossia di tolleranza del sistema immune del ricevente nei confronti dell'organo trapiantato. Entrambi clinicamente verificarono che tale stato non era mai assoluto, completo, ma solo parziale (da cui il termine coniato da Calne di "*prope* tolerance", quasi-tolleranza), permettendo tuttavia di mantenere un'efficace immunosoppressione con dosi di farmaci (ciclosporina, tacrolimus o anche rapamicina in altre successive esperienze) estremamente più basse di quanto fino ad allora immaginato.

Si apriva la strada ad una serie di esperienze cliniche e sperimentali, molte ancora in corso, volte a stabilire i benefici, a breve e lungo termine, di un tale regime di induzione della tolleranza, in termini di diminuzione della tossicità farmacologica, dell'incidenza di infezioni primarie e/o recidive, di tumori nel ricevente di un trapianto d'organo solido. Per quanto riguarda il trapianto di fegato, se un tale regime era in grado di diminuire l'entità della immunosoppressione post-trapianto, sia in termini di dosi giornaliere che di livelli plasmatici, nei pazienti con infezione da HCV questo

dovrebbe o potrebbe consentire una diminuzione dell'entità della replicazione virale, quindi della aggressione virale nei confronti del parenchima epatico e, forse, migliorare così la storia naturale della malattia nel post-trapianto.

Scopo di questo lavoro, dopo alcuni cenni di introduzione sui meccanismi immunitari che portano all'induzione della tolleranza, così come spiegata storicamente e poi da Starzl e Calne, è di descrivere una delle poche esperienze, in Italia, in termini di ricerca della tolleranza nel trapianto di fegato e suoi effetti sulla recidiva di HCV. L'esperienza, condotta presso i Centri Trapianto di Fegato dell'Università di Modena e di Bologna a partire dall'ottobre 2002, è coincisa in gran parte con la durata di questo Corso di Dottorato in "Trapianto di fegato: immunologia clinica e di base ed immunodepressione", e ha già avuto la fortuna di vedere pubblicati, sulla rivista *Transplantation*, i risultati preliminari di questo studio.

## INDICE

<b>Introduzione</b>	<b>pag. 5</b>
<b>Tolleranza immunologica: definizione e meccanismi conosciuti</b>	<b>pag. 7</b>
La tolleranza centrale	pag.7
La tolleranza periferica	pag.9
<b>Tolleranza immunologica nella pratica clinica dei trapianti di organo solido: i progressi degli ultimi 50 anni</b>	<b>pag. 15</b>
<b>Trapianto di fegato e recidiva di HCV: caratteristiche cliniche principali e rapporti con l'immunosoppressione</b>	<b>pag. 21</b>
<b>Possibile influenza di una immunosoppressione tollerogenica e di una diversa regolazione immune della risposta dell'ospite nei confronti della recidiva di HCV</b>	<b>pag.24</b>
<b>Ricerca della tolleranza clinica e recidiva di Epatite C post-trapianto di fegato: effetti a lungo termine dell'induzione con anticorpi policlonali anti-timociti</b>	<b>pag.27</b>
Scopo dello studio	pag.27
Materiali, pazienti e metodi	pag.28
Analisi statistica	pag.29
Risultati	pag.29
<b>Discussione</b>	<b>pag.34</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>pag.39</b>
<b>Tabelle e Figure</b>	<b>pag.41</b>

## **Introduzione.**

Il trapianto allogenico di un organo solido, quale rene, fegato, cuore, polmone ecc., rappresenta ancora oggi l'unica terapia per curare numerose patologie croniche e/o tumorali. Il maggior problema legato ai trapianti rimane però lo sviluppo di una allorreattività immunologica tra donatore e ricevente. Nel trapianto d'organo solido il sistema immune del ricevente sviluppa una reazione contro antigeni HLA diversi, espressi sull'organo trapiantato (graft), cercando così di rigettarlo. Per questo la maggior parte dei pazienti sottoposti a trapianto d'organo sono destinati ad una terapia immunosoppressiva cronica. A tutt'oggi, comunque, il rigetto rappresenta la causa più frequente di complicanze, a breve e lungo termine di un trapianto allogenico. La storia del trapianto è in buona parte costituita dalla storia dell'immunologia e annovera alcune tappe fondamentali, a partire dagli studi pionieristici di Medawar e Gibson<sup>1,2</sup> che nel 1943 scoprirono che il rigetto tissutale è mediato dalle cellule del sistema immune. A questa scoperta si fa risalire la nascita dell'era moderna dei trapianti. Dieci anni dopo, Billingham, Brent e Medawar<sup>3,4</sup> dimostrarono sperimentalmente che la compresenza nello stesso organismo di cellule- leucociti- di donatore e ricevente determinava l'assenza di rigetto verso i tessuti del ceppo del ricevente, ma non verso i tessuti di altri ceppi. Queste osservazioni posero le basi per la nascita del concetto di "sistema HLA", della dimostrazione che la irradiazione con dosi subletali del ricevente lo rendeva anergico nei confronti di tessuti o organi di un donatore (salvo provocare una Graft-versus-host disease, come accadde nei primi esperimenti di trapianto di midollo osseo), aprendo la strada verso il primo trapianto d'organo effettuato da Murray<sup>5</sup> nel 1959 nell'uomo con un rene donato da un fratello (gemello), dopo una TBI (total body irradiation). Nel corso del 1960 si aggiunsero i primi interventi di trapianto di fegato (Starzl 1967)<sup>6</sup>, cuore (Barnard 1968)<sup>7</sup>, e midollo osseo (1968)<sup>8</sup>, l'utilizzo della Azatioprina<sup>9</sup> fornì i primi esempi di immunosoppressione farmacologica senza TBI, seguita dall'utilizzo degli steroidi, sieri anti linfocitari

(ALG)<sup>10</sup>, e finalmente, negli anni Settanta, dalla scoperta ed uso della Ciclosporina A<sup>11</sup>. L'effetto straordinario di questo farmaco consentì di ottenere un'immunosoppressione adeguata a eseguire sia trapianti di midollo, che di organo solido, con risultati sconvolgenti, rispetto al passato, in termini di sopravvivenza dell'organo. Tuttavia la Ciclosporina, o altri farmaci altrettanto se non più efficaci generati più di recente, come il Tacrolimus (FK-506)<sup>12</sup>, la Rapamicina (SRL), il Micofenolato (MMF) mancano della necessaria specificità d'azione per impedire di abbattere completamente la immunità del ricevente verso antigeni diversi da quelli dell'organo trapiantato, causando così temibili complicanze di tipo infettivologico o lo sviluppo di tumori de novo. Molti di loro risultano essere tossici, nel breve o lungo periodo, causando importanti patologie d'organo (nefropatie acute o croniche, neurotossicità, mielotossicità) o interferendo pesantemente con sistemi metabolici importanti (diabete, ipertrigliceridemia, ipercolesterolemia). La somministrazione cronica di questi farmaci, infine, interferendo con delicati meccanismi (vd più avanti) immunitari di selezione clonale ed apoptosi linfocitaria, al tempo stesso impedisce di raggiungere l'obiettivo più ambizioso per un trapiantologo: permettere la tolleranza specifica di un organo da parte di un sistema immune diverso.

## **Tolleranza immunologica: definizione e meccanismi conosciuti.**

La definizione di “tolleranza” ha attraversato l’era della immunologia di volta in volta rinascendo dalle proprie ceneri per arrivare a sempre nuove conquiste. In generale, essa corrisponde alla mancata reazione del “self” – il sistema immune di un ricevente – nei confronti del “non-self” – antigeni del donatore – dopo il suo riconoscimento. Un esempio pratico è dato dal trapianto di tessuti o organi fra gemelli omozigoti, dove la identità molecolare degli antigeni di donatore e ricevente impedisce l’attivazione del sistema immune; questo tipo di trapianto viene accomunato ad un autotrapianto. La tolleranza è la induzione di uno stato di non-responsività del sistema immune dell’ospite nei confronti dell’organo donato in un trapianto allogenico, nel quale l’organo proviene da un donatore NON identico. Senza tolleranza, solo gli autotrapianti e i trapianti singenici (fra gemelli omozigoti) sarebbero possibili.

### **La tolleranza centrale.**

La nascita della ricerca sulla tolleranza si fa risalire alle prime dimostrazioni di Owen (1945) sulla chimera in vitelli gemelli non identici, per la compresenza di cellule ematiche di entrambi in entrambi, in assenza di risposta immunologica verso il non-self<sup>13</sup>. Questo **chimerismo naturale**, descritto da Owen, aveva tutti i caratteri di un riuscito *experimentum naturae* e dimostrava che una forma di tolleranza poteva essere indotta durante la vita prenatale se cellule fetali incontravano cellule “non self” durante il periodo fisiologico di tolleranza immunologica.

Su questa linea seguì anche la teoria espressa da Burnet (1949) che la mancata produzione di anticorpi contro cellule estranee (autologhe) era determinata dalla capacità, acquisita durante la vita fetale, di sviluppare una “tolleranza attiva verso antigeni estranei” del sistema immune<sup>14</sup>. Questi elementi portavano nella direzione,

durante l'ontogenesi, dello sviluppo di un repertorio immunologico ottenuto attraverso un processo di mutazione somatica: qualunque antigene circolante nel timo durante la vita fetale viene riconosciuto come "self" e ciò conduce alla eliminazione del precursore linfocitario clonale anti-self. Finito questo processo di delezione indotta ("clonal deletion"), dopo la nascita il sistema immune è pronto a rispondere solo a quegli antigeni non incontrati durante la vita fetale<sup>15</sup>. Erano state poste le basi per il concetto di **tolleranza centrale**.

Anni dopo, Burnet scriveva che "la necessità e capacità di distinguere tra ciò che si accetta come *self* e ciò che deve essere rigettato come alieno è la base della evoluzione della immunologia"<sup>16</sup>. La scoperta e la comprensione dei meccanismi cellulari e molecolari che contraddistinguono la tolleranza centrale o timica, con i suoi correlati di definizione degli antigeni determinanti la compatibilità nel trapianto d'organo o tessuto (sistema HLA o, più modernamente MHC), e grazie ai quali si poteva introdurre il concetto di individualità antigenico-molecolare, erano ancora lontani a venire, tuttavia questa nuova consapevolezza della individualità della risposta immune condusse ad ipotizzare che la tolleranza verso un allotrapianto (con il trattamento necessaria a produrla e mantenerla) è finalisticamente determinata al *superamento* della primitiva funzione fisiologica del sistema immune: la difesa del self e la eliminazione del non-self<sup>16</sup>.

Questo *superamento* poteva essere indotto, nel ricevente di un allotrapianto, tramite la manipolazione del repertorio immunologico linfocitario anti-*nonself*: l'eliminazione dei linfociti diretti verso il trapianto attraverso le radiazioni o i sieri anti-linfocitari, o come negli esperimenti di Brent e Medawar, l'introduzione di leucociti splenici o di cellule di midollo osseo in ratti immunologicamente immaturi, alterando il meccanismo di riconoscimento del self dal non-self, avrebbe interrotto l'innescò della reazione immune dell'ospite verso il donatore. Dal momento che i linfociti T hanno un ruolo essenziale nel coordinamento delle risposte immunitarie alloreattive, la conoscenza dei meccanismi alla base della tolleranza "fisiologica" dei linfociti T nei confronti degli antigeni *self* è il

presupposto fondamentale per la messa a punto di strategie dirette a indurre tolleranza nei confronti di alloantigeni. In particolare, la tolleranza acquisita verso i tessuti (o organi) di donatore veniva correlata, da quel momento storico in poi, al prodursi di chimerismo leucocitario in soggetti immunologicamente *maturi* attraverso la selezione clonale negativa (o delezione), a livello timico sia dei linfociti T reattivi contro l'ospite che contro il donatore (il self ed il nonself). Come nelle chimere animali di Owen, Brent, Billingham e Medawar, i cloni linfocitari superstiti si dimostravano tolleranti verso antigeni self e non self, ma solo dei tessuti che venivano successivamente trapiantati, lasciando completamente intatta e pienamente reattiva la capacità immune dell'ospite verso il resto dell'immenso repertorio di antigeni non-self.

Tutte queste considerazioni indicano chiaramente che il goal della induzione della tolleranza centrale può essere raggiunto biologicamente attraverso la manipolazione di cellule (o anche molecole, come si capirà dagli studi sull'HLA) capaci di indurre selettivamente uno **stato specifico di non-responsività immune verso gli alloantigeni**.

### **La tolleranza periferica.**

Negli ultimi trent'anni i progressi nello studio della biologia cellulare e molecolare hanno allargato la sfera delle relazioni esistenti fra immunologia, trapianti ed immunosoppressione. Fondamentale in particolare è stata la scoperta, nei modelli animali ed umani, che i linfociti T non sono sufficienti ad indurre tolleranza (o determinare il rigetto) verso un organo trapiantato, ma hanno bisogno della collaborazione di numerose altre sottopopolazioni di cellule immunitarie. In particolare, la distruzione di un organo trapiantato da parte del sistema immunitario del ricevente dipende dall'attività di cellule *effettrici*, (linfociti B, cellule del sistema reticolo-endoteliale, linfociti citotossici o *killer*); il ruolo dei linfociti T è di coordinare e dirigere la funzione delle cellule *effettrici*. Inoltre la

presenza del solo antigene non è sufficiente a determinare l'attivazione dei linfociti T che lo possono riconoscere, ma l'antigene deve essere *processato* e *presentato* ai linfociti T da parte di cellule specializzate, le **cellule che presentano l'antigene (APC, Antigen-Presenting Cells)**. Le **Cellule Dendritiche (DC, Dendritic Cells)** sono le più potenti tra le APC, e si ritiene siano le uniche in grado di indurre l'attivazione dei linfociti T *naive* (quelli che non hanno ancora incontrato l'antigene). I linfociti T sono cellule clonali, cioè ciascun linfocita T esprime un recettore per l'antigene (**TCR, T Cell Receptor**) che lo rende capace di riconoscere un antigene specifico, di natura proteica. La stimolazione del TCR da parte dell'antigene non è però sufficiente a determinare l'attivazione del linfocita T e l'innesco della reazione immunitaria. A questo fine è necessario che il linfocita riceva un secondo segnale, detto costimolatorio, che è mediato dall'interazione di molecole (come il CD28 e il CD154), espresse sulla superficie dei linfociti T, e il CD80/CD86 (B7) e il CD40, espresse sulle cellule che presentano l'antigene. **In assenza del segnale costimolatorio i linfociti T diventano anergici, cioè non sono capaci di rispondere a quell'antigene neanche se questo gli viene ripresentato in modo adeguato.** Dal momento che le molecole di costimolazione sono espresse solo dalle APC, e in particolare dalle cellule dendritiche, perchè una risposta alloimmunitaria abbia luogo è necessario che l'alloantigene sia espresso su DC. Nel caso del trapianto di un organo solido epiteliale, come il fegato, si ritiene che la reazione di rigetto sia innescata dalle DC del donatore che si trovano nel parenchima dell'organo trapiantato (i cosiddetti leucociti "passeggeri"). Questo è stato formalmente dimostrato nei modelli animali, così come si è osservato che la manipolazione delle DC epatiche (così da inibirne la capacità di presentare gli antigeni ai linfociti T) può rappresentare una efficace strategia di prevenzione del rigetto<sup>25</sup>.

I linfociti T attivati producono IL-2 ed espongono sulla membrana il recettore per l'IL-2 (CD25). L'IL-2 ne promuove la proliferazione, che ha luogo nelle aree paracorticali (T-dipendenti) del linfonodo.

I linfociti T attivati si differenziano a linfociti T memoria o a linfociti T effettori, che, a seconda che esprimano l'antigene CD4 o CD8, hanno funzione adiuvante (Th, T-helper) o citotossica (Tc, T-cytotoxic), rispettivamente. Il ruolo dei linfociti T CD4+ Th sembra essere di particolare importanza nel coordinamento delle risposte alloimmunitarie, mentre i linfociti T CD8+ hanno un ruolo essenziale nella distruzione finale dell'organo trapiantato. I linfociti Th agiscono producendo delle molecole proteiche, chiamate citochine, che hanno la funzione di regolare e promuovere la funzione delle cellule del sistema immunitario. In base alle citochine prodotte, i linfociti Th possono essere distinti in Th1, che producono principalmente IL2 ed IFN $\gamma$ , e Th2, che producono IL-4, IL-5, IL10 e IL-13. I Th1 sono essenziali allo svolgimento delle risposte cellulo-mediate, in quanto attivano la funzione di macrofagi, cellule NK e linfociti Tc CD8+, così come alla produzione di determinati anticorpi da parte delle cellule B, mentre i Th2 sarebbero necessari allo svolgimento delle risposte umorali di tipo allergico, o dirette contro i parassiti, caratterizzate cioè dalla produzione di IgE. Il rigetto degli organi trapiantati sembra dipendere dalla polarizzazione dei linfociti Th a Th1, mentre la polarizzazione a Th2 potrebbe invece avere un ruolo protettivo, in quanto può inibire le risposte Th1. Un terzo tipo di linfocita T, definito T regolatorio, o soppressivo, (Tr1, T Regulatory 1, e Th3, T\_Helper 3) è stato descritto più di recente, ed è caratterizzato dalla coespressione del CD4 e del CD25<sup>26</sup>. Queste cellule sembrano capaci di sopprimere le risposte alloimmunitarie, anche se il meccanismo e la specificità della loro azione sono ancora oggetto di studio.

Alcune sottopopolazioni di DC, come le DC plasmocitoidi, che sono state descritte di recente, sembrano avere la capacità di favorire il differenziamento dei linfociti T a Th2 o a Tr, e potrebbero essere coinvolte nel mantenimento della tolleranza immunologica<sup>27</sup>. Il ruolo delle DC plasmocitoidi nella prevenzione del rigetto è al momento un campo di intenso studio tra gli immunologi del trapianto.

Queste ed altre evidenze hanno condotto a supporre che uno stato di tolleranza verso gli alloantigeni possa essere indotto, supportato e mantenuto intervenendo sui meccanismi cellulari e molecolari propri dei linfociti sottoposti a maturazione negli organi linfoidi periferici, da cui il termine di **tolleranza periferica**.

Sebbene i meccanismi che regolano questo tipo di tolleranza in vivo non siano stati ancora completamente delucidati, è possibile tuttavia riconoscere almeno tre scenari nei quali si determini una non-responsività antigene- (donatore-) specifica.

**A) Anergia clonale.** Il riconoscimento da parte di linfociti attivati dell'antigene allogeneico presentato da APC in assenza di segnale costimolatorio renderà i linfociti incapaci di rispondere a quell'antigene: in questo caso, si svilupperà uno stato di anergia clonale che blocca l'espansione e la funzione delle cellule T<sup>17</sup>. Molti recettori di cellule T ed APC probabilmente contribuiscono al rilascio di segnali costimolatori, tuttavia attualmente le evidenze più promettenti indicano nell'attivazione del complesso B7:CD28 il ruolo più importante nell'attivazione dei linfociti T<sup>21,22</sup>, ed anticorpi monoclonali (come il CTLA4-Ig) rivolti verso questi siti sono in grado di produrre una profonda anergia clonale<sup>23</sup>, che è stata sfruttata per esempio nel campo del trapianto allogeneico di midollo osseo nei casi di forte disparità di corredo HLA fra donatore e ricevente<sup>24</sup>.

**B) Activation-induced cell death, AICD.** L'induzione di morte cellulare per apoptosi di linfociti T attivati dall'alloantigene (definita anche **delezione clonale periferica**) è un meccanismo dimostrato di recente, che sembra essere cruciale ai fini del mantenimento della tolleranza periferica nel trapianto<sup>18</sup>. Questo meccanismo viene iniziato dall'IL2 e richiede l'espressione del recettore Fas-ligand (Fas-L, CD40L) sulle cellule T attivate che successivamente vengono indotte all'apoptosi. Questo meccanismo è stato recentemente collegato con successo all'accettazione di trapianti allogeneici di cornea<sup>19</sup>. Inoltre, dato che l'assenza di segnale costimolatorio è coinvolta nel riconoscimento del "self", queste evidenze

forniscono ulteriore supporto al ruolo dei farmaci bloccanti il 2° segnale nell'induzione della tolleranza, in quanto questa strategia mima quella propria dei meccanismi "fisiologici" del sistema immune<sup>20</sup>.

**C) Sviluppo di linfociti T, progenitori mieloidi o cellule derivate dallo stroma con funzione di regolatori o soppressori.** Sebbene molti ricercatori abbiano proposto a lungo diverse linee cellulari con qualità di "soppressori degli effettori", solo recentemente sono stati identificati i cosiddetti linfociti *T regolatori* (Tr1)<sup>28</sup> capaci di inibizione allo-specifica grazie al rilascio di citochine quali il transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) o l'IL10, o altrimenti un sottotipo di linfociti T NK, il cui ruolo critico consiste nella inibizione della GVHD per mezzo di citochine Th2, e nello sviluppo di tolleranza *sistemica* associata alla stimolazione con alloantigeni in un sito immuno-privilegiato<sup>31,32</sup>, suggerendo che i linfociti NK sono coinvolti nella tolleranza del self e dell'allograft. D'altra parte, è stato anche proposto che la manipolazione – abolizione- delle cellule T Th1, con le loro citochine proattivatrici IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ , può costituire una valida strategia alternativa nell'induzione della tolleranza allospecifica<sup>30</sup>. I progenitori mieloidi CD34, a seconda che esprimano il recettore CD86, funzionano come potenti APC, in grado di polarizzare linfociti T e B, ma anche le DC, verso un pattern più o meno immunogenico di risposta verso alloantigeni<sup>33</sup>. L'infusione di cellule CD34 non immunogeniche (CD40-) avrebbe il razionale, nei trapianto di midollo osseo o di organi solidi, di ridurre il rischio di rigetto attraverso l'effetto protollerigeno nei confronti di linfociti ed altre APC. Cellule derivate dallo stroma del midollo osseo, inoltre, mancando di attività costimolatoria, potrebbero avere un ruolo indiretto nell'indurre tolleranza nelle cellule T; questo è il caso, per esempio, dei cheratinociti<sup>34</sup>, delle cellule endoteliali<sup>35</sup>, mentre le cellule progenitrici mesenchimali del midollo osseo, in alcuni studi, hanno dimostrato di indurre direttamente uno stato di profonda non responsività delle cellule T *antigene-indipendente*<sup>36,37</sup>.

Le cellule dendritiche (DC) sono ormai considerate, fra le APC *professionali*, le più promettenti in termini di regolazione dell'alloreattività e produzione di citochine delle cellule T; in particolare, è ormai acquisito che **le DC2**, determinando la polarizzazione verso risposte Th2, **sono in grado di indurre una tolleranza centrale e periferica prevenendo l'attività citotossica antigene-specifica delle cellule T**<sup>38</sup>. Più di recente, alcuni gruppi hanno proposto l'utilizzo di colonie di PBSC (peripheral blood stem cell), mobilizzate tramite infusione di G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor), contenenti alte concentrazioni di DC2, per limitare l'alloreattività anti-host delle cellule T dopo trapianto di midollo, allo scopo di diminuire la gravità della GVHD<sup>39</sup>; queste colonie sono infatti in grado di polarizzare i linfociti verso risposte Th2 mediate da IL4 e IL10<sup>40</sup>, non tramite un'azione diretta, bensì attraverso l'incremento delle DC2 circolanti<sup>41</sup>, al tempo stesso riducendo la secrezione di TNF- $\alpha$ <sup>42</sup>. Questa potente citochina infatti è in grado di potenziare l'efficienza di presentazione dell'antigene delle DC, e perciò il pretrattamento con G-CSF può prevenire- diminuire la funzione delle APC e quindi dell'attività citotossica T-mediata<sup>43</sup>.

## **Tolleranza immunologica nella pratica clinica dei trapianti di organo solido: i progressi degli ultimi 50 anni.**

Le molteplici osservazioni sperimentali testè analizzate portano tutte ad indicare che il traguardo della tolleranza immunologica, nella pratica clinica dei trapianti, può essere raggiunto non solo tramite farmaci immunosoppressori con lo scopo di ridurre o abolire il rigetto o la GVHD, ma soprattutto tramite la manipolazione biologica di cellule e/o molecole capaci di indurre selettivamente uno stato di non-responsività antigene-specifica. Una svolta radicale nel modo di concepire i rapporti fra sistema immune dell'ospite, organo trapiantato ed immunosoppressione si è verificata a partire dagli anni '90, quando, con il perfezionarsi delle prime sonde PCR, si ricominciò ad indagare su un tema colpevolmente dimenticato, quale i rapporti fra chimerismo e tolleranza.

Come già visto attraverso le prime esperienze di Burnet, l'induzione della tolleranza tramite chimerismo si riferisce ai meccanismi centrali di selezione negativa (delezione) di linfociti T reattivi sia verso l'ospite che verso il donatore. Nei moderni modelli sperimentali di chimera animale, infatti si è documentato che sia i linfociti (o progenitori) del donatore che dell'ospite emigrano – si localizzano – nel timo dove si differenziano in DC e timociti; queste cellule mediano la selezione dei T-cloni reattivi verso ospite e donatore, quindi emigrano dal timo verso la periferia, colonizzandola. Al momento del trapianto, il ricevente sarà tollerante verso gli antigeni propri e del donatore, che a quel punto saranno “operativamente” simili ai propri<sup>45</sup>. Nel campo dei trapianti di organo solido, i gruppi di ricercatori guidati da T. Starzl presso l'Università di Pittsburgh, e da R. Calne presso l'Università di Cambridge, indiscussi pionieri e protagonisti dell'epoca moderna dei trapianti soprattutto di fegato e rene, non hanno mai smesso di produrre osservazioni sperimentali e cliniche sulla ricerca della tolleranza. In una analisi storica incredibilmente dettagliata, T. Starzl notava che nei primi trapianti d'organo la sopravvivenza libera da rigetto era possibile grazie

all'adozione di un regime di "induzione al trapianto" del ricevente che veniva "citoablato" tramite irradiazione totale subletale, ovvero di pre-trattamento con Azatioprina per alcune settimane oppure ancora con la infusione di sieri di immunoglobuline anti-linfociti umani, similmente a quanto fatto nei primi esperimenti di trapianto di midollo osseo. A posteriori, i migliori risultati in termini di lungo-sopravvivenza libera da rigetto si verificarono in quei riceventi di organi HLA-simili, quali quelli provenienti da fratelli gemelli o consanguinei, mentre gli effetti del rigetto diventavano drammatici in caso di donatore HLA-diverso, con graft loss ad un anno > 35%. Nel 1968, grazie ai primi studi sul cariotipo cellulare e fenotipo HLA, la pratica clinica del trapianto di midollo osseo venne progressivamente estesa anche a coppie di donatore-ricevente non consanguinei, con un buon grado di HLA-matching, in maniera da evitare la reazione di GVHD. In questo campo la ricerca del chimerismo (e quindi della tolleranza) tramite pre-condizionamento del ricevente non fu mai abbandonata, mentre nei trapianti di organo solido, l'arrivo della ciclosporina pose le basi per la "ricerca della sconfitta del rigetto" mediante regimi di immunosoppressione sempre più potenti, dimenticando la lezione fondamentale di Burnet ed Owen. Eppure, nel 1969 Starzl dimostrava che, in pazienti femmine trapiantate con fegati da donatore cadavere maschio, entro 100 giorni si verificava la sostituzione dei leucociti passeggeri e cellule di Kupffer con cellule cariotipicamente femmine, mentre il resto dei tessuti dell'organo restava maschio<sup>46</sup>. Calne inoltre dimostrava il prodursi di tolleranza spontanea in ratti e maiali riceventi un trapianto di fegato da ceppi non consanguinei, dopo una iniziale, autolimitante reazione di rigetto<sup>47</sup>. Sempre in quegli anni, la dimostrazione di un "adoptive transfer of donor cellular immunity" si verificò con la dimostrazione che riceventi di fegato o rene acquisivano un nuovo corredo di immunoglobuline donatore-specifiche<sup>48</sup>, mentre nel 1984 si dimostrò che la persistenza di isoagglutinine anti-emazie del donatore di fegato ABO compatibile ma non identico erano la causa dei fenomeni di emolisi che si producono nel ricevente dopo trapianto<sup>49</sup>. Cominciava a farsi strada, a supporto del

microchimerismo, il concetto che, anche nei trapianti d'organo solido, la migrazione nei due sensi di leucociti passeggeri era un fenomeno costante<sup>50</sup>, sebbene all'inizio ritenuto temporaneo e quindi ininfluenza ai fini del mantenimento di una *immunità adottiva*.

Queste osservazioni sporadiche sul (micro)chimerismo sono state riprese solo a partire dagli anni '90, dopo che, nei primi pazienti sottoposti a trapianto di fegato o rene e lungosopravvissuti le sonde PCR rivolte verso antigeni HLA del donatore o verso i cromosomi X ed Y permisero di dimostrare la compresenza, in periferia, di colonie di linfociti con fenotipo caratteristico del donatore, con concentrazioni costantemente maggiori nei riceventi di trapianto di fegato<sup>51,52</sup>. Era questa l'evidenza che nel trapianto di midollo osseo o nei trapianti di organi solidi, dati uguali presupposti di partenza (induzione con citoablazione del ricevente, trasferimento con l'organo di precursori emolinfopoietici del donatore e loro persistenza negli organi linfoidi periferici del ricevente) il risultato finale doveva essere identico: il prodursi di microchimerismo donatore-ricevente doveva permettere l'attecchimento dell'organo ("engrafting") in uno stato di "donor-specific T cell unresponsiveness".

Starzl speculava che questo stato dipendeva dal prodotto di una doppia reazione immune, di host-versus-graft (HVG) e graft-versus-host (GVH), grazie alle quali i linfociti di donatore e ricevente, reagendo gli uni verso gli altri, causavano un esaurimento T-clonale centrale seguito da delezione clonale periferica reciproca ("reciprocal clonal exhaustion-deletion mechanism of engraftment")<sup>51,52</sup>. Se entrambe le reazioni potessero essere mantenute e sostenute ugualmente intatte ed immunosopresse, si produrrebbe una reciproca tolleranza al di là delle limitazioni di engraftment indotte da un imperfetto HLA-matching, come si verifica nel trapianto da donatore cadavere. Perché ciò accadesse, era necessario ridurre, non eliminare, l'iniziale reazione HVG tramite un regime citoablativo di preparazione del ricevente; dopo il trapianto, questa situazione avrebbe consentito il passaggio dei leucociti passeggeri del donatore dal graft agli organi linfoidi del ricevente,

consentendo il loro engraftment. Dopo una adeguata ripopolazione, la successiva, possibile reazione di GVH poteva essere impedita tramite un regime di immunosoppressione minimale, che non interferisse con il prodursi dinamico, nel tempo delle due reazioni immuni<sup>57</sup>. La relazione fra microchimerismo e tolleranza, a quel punto, veniva consolidata negli anni successivi dalla comparsa ed il successo, soprattutto nel trapianto di midollo osseo, delle cosiddette induzioni farmacologiche non-citomieloablative, derivate dalla sperimentazione animale ai fini della eliminazione della pericolosa “total body irradiation”<sup>53</sup>, che aprivano la strada verso i primi trapianti con infusione di cellule emolinfopoietiche tratte dal midollo osseo di donatore cadavere<sup>54</sup>, o anche vivente da donatore consanguineo<sup>55</sup>. In queste prime esperienze cliniche, i riceventi venivano preparati tramite pre-trattamento con infusione di anticorpi policlonali anti-timociti ad alte dosi, nei giorni precedenti o al momento del trapianto prima della rivascolarizzazione del graft; nel 1998 Calne<sup>56</sup> per primo utilizzò come induzione, in 13 riceventi di trapianto di rene, un anticorpo monoclonale rivolto verso il recettore CD52 presente sui linfociti B e T del ricevente, denominato Alemtuzumab, seguito qualche giorno dopo il trapianto da immunosoppressione con ciclosporina, e scoprì che era possibile evitare il rigetto con dosi veramente minime di questo farmaco. La persistente, seppur minima necessità di immunosoppressione post-trapianto, portava Calne pragmaticamente a definire come obiettivo accettabile il raggiungimento non già di una tolleranza assoluta (assenza di immunosoppressione) ma di una quasi tolleranza (“*prope tolerance*”), con la quale diminuire il pericolo, nei lungo-sopravvivenenti, di effetti tossici indelebili dovuti all’immunosoppressione cronica. Nel 2001 ancora Starzl iniziava un protocollo di induzione alla tolleranza su riceventi di trapianto di rene, fegato, pancreas, intestino e polmone, i cui risultati venivano pubblicati su Lancet nel 2003<sup>58</sup>; incoraggiato dai risultati positivi di un precedente trial del 1997 su 95 lungo-sopravvivenenti di trapianto di fegato<sup>59</sup>, nel nuovo protocollo si spingeva a proporre uno schema di “weaning” (riduzione graduale) dell’immunosoppressione

primario, il tacrolimus, fino alla dose minima consentita senza rigetto, ottenendo di portare, gradualmente e non senza preoccupazioni, alcuni pazienti a dosi singole di immunosoppressori somministrate anche una sola volta a settimana. Questa esperienza è stata successivamente ripetuta da R. Shapiro nei trapianti di rene<sup>60</sup>, confermando la possibilità, dopo un regime di induzione della tolleranza con anticorpi policlonali anti-timociti, di effettuare un weaning progressivo dell'immunosoppressore primario con una percentuale contenuta di rigetto acuto.

Nel corso degli ultimi anni, numerose altre esperienze cliniche, in praticamente ogni tipo di trapianto di organo solido, hanno confermato, se non la possibilità di lasciare completamente senza immunosoppressione il ricevente, di indurre pragmaticamente quello stato già definito di "prope tolerance"; la comparsa di rigetto acuto è un evento clinico quasi ineludibile, nonostante i regimi di pretrattamento, assumendo talvolta forme alternative, quali quelle dei rigetti acuti umorali o mediati dall'attivazione-infiltrazione tissutale di monociti, cellule NK o anche granulociti eosinofili, che non vengono efficientemente colpiti dagli anticorpi mono- o policlonali antilinfocitari. Tuttavia quasi sempre il rigetto acuto è dominabile con i normali mezzi terapeutici, permettendo in ogni caso il ritorno ad una situazione di "minimizzazione dell'immunosoppressione", che non interferisca con il raggiungimento e mantenimento di un alto grado di "donor-specific nonreactivity".

Sebbene, col tempo, autorevoli voci discordi si siano pronunciate sulla impossibilità di raggiungere la tolleranza nei trapianti con questi metodi<sup>61,62</sup>, tuttavia l'importanza della rinascita degli studi clinici e sperimentali sulla tolleranza è stata salutata, dalla prestigiosa rivista *Transplantation* nel 2004 con un intero numero dedicato ad un Forum sulla induzione della tolleranza, ed agli importanti risvolti etici sottostanti questo tipo di ricerca clinica sulla salute e sopravvivenza dei riceventi<sup>63</sup>; gli Editors P. J. Morris e A. P. Monaco, ricordando che il 2003 è stato il cinquantesimo anniversario dalla scoperta della tolleranza immunologica di Medawar e colleghi, concludevano esprimendo intensa soddisfazione per

l'elaborazione di linee guida chiare e definite per la produzione di nuovi protocolli di ricerca sulla tolleranza clinica.

## **Trapianto di fegato e recidiva di HCV: caratteristiche cliniche principali e rapporti con l'immunosoppressione.**

La cirrosi epatica legata alla infezione cronica da virus dell'Epatite C (HCV) è attualmente una tra le principali indicazioni al trapianto di fegato nei paesi occidentali, costituendo un buon 50% del numero di trapianti di fegato eseguiti ogni anno in Europa e USA. La persistenza del virus nel ricevente, e la necessità di immunosoppressione, è la causa determinante della recidiva "universale" dell'HCV post-trapianto; tuttavia il decorso clinico della re-infezione del graft è assolutamente variabile, la sindrome clinica che ne deriva potendo variare da una epatite cronica lieve, caratterizzata clinicamente da un modesto rialzo delle transaminasi ed istologicamente da sporadici focolai di necrosi a livello lobulare e minimo infiltrato infiammatorio a livello portale, fino ad una sindrome colestatica rapidamente progressiva, caratterizzata al contrario da intensa epatocitolisi, colestasi e coagulopatia ed istologicamente da rigonfiamento cellulare con necrosi a ponte ed intensi fenomeni fibrotici con colestasi intraepatica, tale da condurre ad una rapida insufficienza del graft entro un anno dalla comparsa. Nel complesso, post-trapianto il decorso si presenta accelerato rispetto a quello nel soggetto immunocompetente, e la storia naturale della recidiva progredisce fino a cirrosi nel 6-23% dei soggetti interessati in un intervallo mediano di 3 anni, con una probabilità cumulativa di cirrosi del 30% entro 5 anni, e di scompenso clinico entro un anno dallo esso<sup>64</sup>. Le variabili cliniche statisticamente correlate ad un decorso peggiore sono comunemente gli alti livelli di replicazione virale sia pre- che post-trapianto, il genotipo virale (in particolare il cosiddetto 1b), l'età del donatore > 50 anni, ed infine le caratteristiche della risposta immune dell'ospite nei confronti della reinfezione virale, e dell'immunosoppressione utilizzata.

Sulla importanza delle caratteristiche della risposta immune dell'ospite nella patogenesi della recidiva di HCV post-trapianto si sono concentrati gli sforzi congiunti di immunologi ed infettivologi; l'ipotesi patogenetica si basa sul

presupposto che una maggiore compatibilità donatore-ricevente fra alleli diversi del sistema HLA possa proteggere contro le reazioni di rigetto acuto e/o cronico, al tempo stesso provocando una risposta immune più potente in presenza di nuovi antigeni, quali quelli espressi tipicamente sulla superficie epatocitaria del graft dopo reinfezione virale da HCV<sup>65</sup>. Tali neoantigeni vengono prontamente presentati e riconosciuti da linfociti T infiltranti il parenchima epatico, dando l'avvio ad una potente reazione immunologica, che finirebbe con lo scatenarsi contro gli epatociti che presentano tali neoantigeni, in ultima analisi inducendo danno istologico. I risultati espressi da gruppi di ricerca differenti sono stati contraddittori<sup>66,67</sup>, in generale però questi studi confermano che una iperreattività linfocitaria antigene-specifica è sicuramente coinvolta nella patogenesi del danno sul graft. Gli studi di immunoistochimica e di immuno-fenotipizzazione epatica con gli anticorpi monoclonali<sup>68</sup> hanno evidenziato che uno dei principali meccanismi patogenetici di danno epatocellulare è sicuramente mediato dalla presenza di grandi quantità di linfociti T citotossici (CTL) attivati contro l'antigene virale espresso sulla superficie epatocitaria (risposta immune HLA-I ristretta), la cui azione è resa possibile anche da grandi quantità di molecole di adesione intercellulare sulla superficie degli epatociti infettati (ICAM), e di molecole di adesione dell'endotelio vascolare (VCAM) che permettono la migrazione e reclutamento di grandi quantità di cellule linfocitarie ed infiammatorie dai sinusoidi epatici verso gli spazi portalì ed il lobulo epatico. Per ultimo, i CTL intraepatici HCV-specifici attivati da determinate sequenze nucleotidiche dell'HCV<sup>69</sup> amplificano il danno epatocitario producendo le citochine proinfiammatorie IL-2, TNF- $\alpha$  ed IFN- $\gamma$ . D'altra parte, in diversi studi è stato posto l'accento sul ruolo giocato dai meccanismi immuni HLA-II ristretti nei confronti dell'infezione da HCV; questi meccanismi implicano la presentazione dell'antigene virale da parte di APC professionali con l'attivazione di linfociti Th1, che mediano e regolano l'immunità cellulo-effettrice<sup>70</sup>. Entrambi i meccanismi possono determinare una risposta immune simile a quelle del tipo di ipersensibilità ritardata dove la lisi

delle cellule bersaglio tramite produzione e rilascio locale, da parte di CTL e macrofagi attivati, di radicali liberi, ossido nitrico ed enzimi litici lisosomiali, finisce con l'infliggere al tessuto circostante un danno che si perpetua cronicamente data l'evasività e la capacità intrinseca dell'HCV di persistere nell'individuo infettato<sup>71</sup>.

Il tema decisivo dell'influenza negativa dell'immunosoppressione sull'*outcome* della recidiva di HCV è stato affrontato con decisione negli ultimi anni; l'introduzione nella pratica clinica, a partire dagli anni '90, di farmaci immunosoppressori nuovi e più potenti (Tacrolimus, MMF, anticorpi monoclonali anti-IL2r basiliximab e daclizumab, non ultimo il Sirolimus), combinati in regimi multipli erroneamente definiti di "induzione", hanno sì comportato, come già evidenziato da Starzl, la drammatica riduzione dei fenomeni di rigetto, ma al prezzo di provocare un cospicuo aumento dei loro effetti collaterali, tossicità a carico di organi, mielosoppressione, aumento delle infezioni opportunistiche o recidive. Nel caso dell'HCV, questo ha determinato un fenomeno importante, statisticamente rilevato da molti centri trapianto, quale quello di un outcome peggiore nei pazienti trapiantati più di recente<sup>72</sup>; l'iniziale potente immunosoppressione multipla inibisce drammaticamente l'immunità cellulo-mediata contro l'HCV determinando un enorme incremento della replicazione virale e dell'ingresso di virioni negli epatociti del graft, comportandone la totale colonizzazione entro i primi mesi post-trapianto. La brusca diminuzione dell'immunosoppressione al momento della recidiva clinica dell'HCV, o per diminuirne gli effetti tossici a breve e lungo termine, con la conseguente ricostituzione dell'immunità cellulo-mediata provoca una potente reazione immune dell'ospite verso gli epatociti che espongono gli antigeni HCV, causando un grave, tipico danno istologico immuno-mediato che può progredire fino alle forme più severe di recidiva<sup>73</sup>.

Nessun regime di immunosoppressione sperimentato negli ultimi anni ha mostrato alcun vantaggio nei confronti dell'indice di recidiva HCV post-trapianto, dei livelli di replicazione virale nel ricevente, della sopravvivenza a breve o lungo termine dopo recidiva.

## **Possibile influenza di una immunosoppressione tollerogenica e di una diversa regolazione immune della risposta dell'ospite nei confronti della recidiva di HCV.**

Nell'ottobre 2002, presso il Centro Trapianti di Fegato e Multiviscerale dell'Università di Modena e Reggio Emilia, allora diretto dal Prof. Antonio D. Pinna, sulla scorta dei primi dati favorevoli, seppur preliminari, apparsi sulle prime pubblicazioni al riguardo, ha avuto inizio la prima esperienza in Italia di induzione della tolleranza in pazienti con trapianto di fegato. In questo protocollo, durato fino al novembre 2003, sono stati consecutivamente arruolati 61 pazienti sottoposti a trapianto di fegato da donatore cadavere (42) o vivente (19), con indicazioni varie (tab. 1). Di questi, 27 pazienti avevano come indicazione la cirrosi epatica post-necrotica da HCV. Il disegno del protocollo prevedeva, per tutti i pazienti, una induzione alla tolleranza tramite pre-trattamento con una infusione ev di 5 mg/kg di Thymoglobuline, un anticorpo policlonale anti-timociti, seguita da una monoterapia con Tacrolimus (FK 506), i cui livelli nel primo anno post-trapianto non dovevano superare i 10 ng/ml. Lo studio non prevedeva la somministrazione di altri farmaci immunosoppressori, se non in caso di rigetto acuto o cronico istologicamente confermato. Nei pazienti clinicamente stabili, a partire dal 3° mese postoperatorio, era prevista l'effettuazione, secondo una tabella prestabilita, della graduale riduzione dell'immunosoppressore primario ("weaning") fino alla dose minima consentita senza fenomeni di rigetto, secondo le indicazioni emerse dallo studio effettuato da Starzl presso il Centro trapianti di Pittsburgh. Il fine era quello di verificare clinicamente l'avvenuta induzione della tolleranza, attraverso la minimizzazione della immunosoppressione post-trapianto, perseguendo l'obiettivo di ridurre le complicanze dovute all'eccessiva esposizione cronica all'immunosoppressione spesso praticata in questi pazienti. Nei 27 pazienti con cirrosi HCV-relata, al fine di verificare l'influenza (positiva o negativa) di un tale regime di immunosoppressione sulla eventuale recidiva di HCV post-trapianto, per ogni paziente veniva effettuata la determinazione dell'HCV-RNA con una PCR

quali- e quantitativa al trapianto (insieme al genotipo virale), dopo una settimana ed un mese, al momento del sospetto clinico della recidiva (elevazione delle transaminasi) e ad ogni biopsia epatica; in caso di risultato consistente con una diagnosi istologica di recidiva, si effettuava il grading dell'inflammation e staging della fibrosi secondo Ishak<sup>74</sup>. I risultati complessivi di questo protocollo di induzione della tolleranza sono stati oggetto di diverse comunicazioni a congressi internazionali durante il 2004, mentre nel 2005 veniva pubblicato sulla rivista *Transplantation* uno studio retrospettivo sul confronto fra i risultati in termini di influenza sulle caratteristiche della recidiva HCV dell'applicazione di un regime di induzione della tolleranza contro una immunosoppressione convenzionale basata su tacrolimus e steroidi<sup>75</sup>. Sebbene l'incidenza complessiva e la gravità del rigetto acuto non mostrasse differenza statistica nei due gruppi, il pretrattamento con Thymoglobuline aveva permesso la minimizzazione delle dosi e dei livelli, ed un weaning efficace di Tacrolimus a tutti gli intervalli di tempo misurati entro un anno dal trapianto, rispetto al gruppo HCV con immunosoppressione convenzionale. Per quanto riguarda le caratteristiche della recidiva, sebbene l'incidenza complessiva non dimostrasse differenza statistica nei due gruppi, tuttavia alcune importanti differenze erano emerse: la epatocitonecrosi era più pronunciata e di più precoce comparsa nel gruppo Thymo, così come l'intervallo libero da recidiva istologica, sebbene il grading e lo staging della recidiva non dimostrasse differenze statisticamente significative nei due gruppi. Tuttavia il picco di replicazione virale (HCV-RNA quantitativo) risultava sempre statisticamente meno elevato nel gruppo Thymo, ed inoltre si verificava una caratteristica diminuzione del numero di leucociti insieme con l'inversione del rapporto CD4/CD8 lungo tutto il periodo di follow-up esaminato. Nella discussione si sottolineava con forza che, sebbene questi risultati fossero da ritenersi preliminari e l'esiguità dei due gruppi non permettesse di trarre conclusioni sostanziali, tuttavia l'applicazione di un regime di "prope-tolerance" nei pazienti HCV permetteva la diminuzione efficace dei livelli di immunosoppressione, che a sua volta comportava la riduzione, almeno a breve

termine, della replicazione virale extraepatica, probabilmente in relazione ad una risposta più vigorosa della immunità cellulare dell'ospite nei confronti del virus; nonostante il follow-up non lungo (dal trapianto fino alla comparsa della recidiva virologicamente ed istologicamente determinata), questo dato risultava di sostanziale beneficio e stimolava la pubblicazione di studi di confronto ai fini della verifica del miglioramento delle caratteristiche cliniche e della sopravvivenza a più lungo termine dopo recidiva HCV, insieme con l'analisi di risultati dopo la eventuale applicazione di terapia antivirale.

## **RICERCA DELLA TOLLERANZA CLINICA E RECIDIVA DI EPATITE C POST-TRAPIANTO DI FEGATO: EFFETTI A LUNGO TERMINE DELL'INDUZIONE CON ANTICORPI POLICLONALI ANTI-TIMOCITI.**

### **Scopo dello studio.**

Il presente studio, oggetto di ricerca durante i tre anni del Corso di Dottorato in "Trapianto di fegato: immunologia clinica e di base ed immunodepressione", ha l'obiettivo di indagare l'influenza, sulla severità della recidiva HCV post-trapianto e sopravvivenza a lungo termine, di un regime di induzione della tolleranza basato sul pre-trattamento del ricevente con anticorpi policlonali anti-timociti (Thymoglobuline®, rabbit anti-thymocyte globuline), e minimizzazione della immunosoppressione postoperatoria basata su monoterapia con Tacrolimus (Prograf®, FK-506). E' stata inoltre valutata l'influenza di tale regime anche ai fini della efficacia, in termini di risposta clinica, virologica ed istologica della terapia antivirale nei pazienti nei quali sussisteva indicazione al trattamento. I risultati sono stati retrospettivamente comparati con quelli di un gruppo di pazienti HCV sottoposti ad un regime convenzionale di immunosoppressione basato su Tacrolimus e steroidi a scalare.

### **Materiali, pazienti e metodi.**

Di 62 pazienti arruolati nel protocollo thymoglobuline con varie indicazioni al trapianto di fegato, 30 risultavano positivi all'HCV-RNA qualitativo pre-trapianto e senza coinfezione virale HBV-HDV. Questi pazienti sono stati sottoposti, all'inizio del trapianto, ad una infusione ev con una dose di 5 mg/Kg di Thymoglobuline, della durata di 4 ore, e a partire dalla prima giornata p.o., ad una monoterapia di mantenimento con Tacrolimus, partendo da un dosaggio di 0.15 mg/kg in due dosi, fino a raggiungere un livello massimo di 10 ng/ml.

Altri 42 pazienti HCV-RNA positivi, che non avevano partecipato al protocollo, costituiscono il gruppo di confronto; in questi pazienti l'immunosoppressione utilizzata prevedeva la somministrazione di un bolo di steroidi intraoperatorio (Metilprednisolone 1 g), successive dosi scalari fino a terminare entro i 90 giorni p.o., ed un mantenimento con Tacrolimus per raggiungere un livello massimo di 12 ng/ml.

Nel gruppo Thymoglobuline, i pazienti in condizioni cliniche stabili da almeno due mesi, e che avevano espresso consenso, sono stati sottoposti ad un regime predefinito di "weaning" dal mantenimento dell'immunosoppressione, al fine di verificare se il pretrattamento poteva effettivamente diminuire l'esposizione cronica all'immunosoppressione, e se questa produceva vantaggi sulla eventuale recidiva di HCV. A questo scopo, i dosaggi e livelli di tacrolimus nei due gruppi sono stati valutati ai giorni 30, 90, 270, 1 anno e fine follow-up, e inoltre sono stati annotati il numero di episodi di rigetto acuto istologicamente verificato, numero di trattamenti ed esito degli stessi.

In entrambi i gruppi, l'elevazione delle transaminasi seriche GOT e GPT, e/o degli enzimi di colestasi epatica (bilirubinemia totale e diretta, fosfatasi alcalina, gammaGT) motivava l'esecuzione di una biopsia epatica percutanea per la verifica istologica del rigetto (graduato come lieve, moderato, grave secondo lo schema Banff) o di lesioni istologiche compatibili con recidiva HCV, applicando in questo caso lo score del grading e staging secondo Ishak. La conferma della recidiva necessitava anche della contemporanea positività della PCR quantitativa per l'HCV-RNA (valore soglia 600 copie/mL). Quest'ultima è stata valutata anche ad una settimana, ad un mese dal trapianto ed ad ogni visita ambulatoriale di follow-up.

Dopo la conferma di recidiva HCV, i pazienti di entrambi i gruppi sono stati sottoposti, dopo consenso informato, ed in assenza di note controindicazioni (instabilità clinica, rigetto sospetto o confermato, anamnesi di autoimmunità, non-compliance) ad una terapia antivirale basata sulla somministrazione di interferone

alfa2b peghilato (dosaggio di 1 mcg/kg/sett s.c.) e ribavirina (dosaggio minimo 200 mg x3/die per os) per un minimo di 6 mesi (genotipo non-1b) ed un anno (genotipo 1 b). Per contrastare i noti fenomeni avversi di anemizzazione e leuco-neutropenia sono stati utilizzati fattori di crescita eritrocitari (eritropoietina 5000 U s.c. x3/sett) e leucocitari (GCSF 5 mcg/kg s.c. x3/sett) per ottenere livelli stabili di Hb = 10 g/L e GB = 1000/ $\mu$ L. Durante il periodo di trattamento, per sorvegliare l'efficacia la ricerca dell'HCVRNA è stata effettuata in media ogni 3 mesi, ed una biopsia epatica ogni 6 mesi; altre biopsie sono state effettuate solo se clinicamente indicato. L'esito della risposta (virologica ed istologica) al trattamento antivirale è stato definito come risposta al termine del trattamento (end-of-treatment response, ETR) e dopo sei mesi dal termine (sustained response, SR). L'influenza del pretrattamento con Thymoglobuline, e dell'interferone alfa2b sul sistema immune dell'ospite è stata valutata analizzando il numero complessivo di leucociti, linfociti, e dei CD4 e CD8 nei due gruppi a diversi intervalli di tempo dal trapianto.

### **Analisi statistica.**

Tutti i risultati sono indicati come media  $\pm$  deviazione standard (DS), il confronto fra valori medi dei due gruppi è stato effettuato tramite Student's *t* test, altrimenti il test del chi-quadro è stato utilizzato per il confronto delle percentuali. Gli indici di sopravvivenza e relative curve di confronto sono state calcolate con il metodo di Kaplan-Meier, e confrontate tramite test Log-rank. Il valore soglia di differenza statisticamente significativa è stato  $p = 0.05$  in tutti i casi.

### **Risultati.**

Nella **tabella 1** sono indicati età al trapianto, sesso, tipo di trapianto, MELD score al trapianto, età del donatore e percentuale di genotipo 1b nei due gruppi.

La sopravvivenza attuariale ad 1 e 4 anni è stata rispettivamente di 90% (Thymo) vs 92%, e di 78% (Thymo) vs 82%,  $p=NS$ ; la mortalità complessiva è stata di 6/30 (20%) per Thymo e di 8/42 (19%). Nel gruppo Thymo, nel primo anno si sono verificati 3 decessi (1 sepsi da candida, 1 aspergilloso disseminata, 1 MOF da colestasi cronica), e 4 nell'altro gruppo (1 esiti di PNF, 1 infarto miocardio massivo, 1 broncopolmonite da HSV, 1 sepsi da Gram negativi). Gli altri 3 decessi del gruppo Thymo si sono verificati alla 477, 646 e 710 giornata p.o. (rispettivamente per esiti di recidiva colestatica di HCV, sepsi in paziente con ascessi epatici da stenosi ischemiche biliari multiple, suicidio in paziente con recidiva HCV); nell'altro gruppo, i decessi sono stati causati in 2 casi da insufficienza epatica terminale post-recidiva HCV (1006 e 1508 giornata p.o.), 1 recidiva post-trapianto di HCC con metastasi diffuse (775 p.o.) ed infine 1 sepsi in paziente con ascessi epatici da stenosi ischemiche biliari multiple (556 p.o.). In **figura 1** è riportata la curva di sopravvivenza attuariale di Kaplan-Meier tra i due gruppi; il test Log-rank non ha dimostrato differenze statisticamente significative.

Per quanto riguarda l'immunosoppressione, nel gruppo Thymo si sono verificati 12 episodi di rigetto acuto (incidenza 40%), di cui 10/12 di grado lieve e trattati solo con un bolo ev di metilprednisolone 1 g e adeguamento della dose orale di tacrolimus, mentre nel gruppo convenzionale vi sono stati 20 episodi di rigetto acuto (incidenza 47,6%) di cui 13/20 lievi e trattati come sopra. In ambedue i gruppi vi sono stati 1 episodio di rigetto grave trattato con un protocollo di OKT3 ev; nei rimanenti casi di rigetto moderato (Thymo 1/12, 8,3% vs non-Thymo 6/20, 30%,  $p<0,05$ ), invece è stato somministrato un riciclo di steroidi ev per una settimana. Nessun graft è stato perso per esiti di rigetto acuto, né si sono verificati casi di rigetto cronico. In **tabella 2** sono riportati dosaggi e livelli plasmatici di Tacrolimus nei due gruppi ai giorni 30, 90, 270, 1 anno e fine follow-up; l'induzione con thymoglobuline ha consentito di diminuire in maniera statisticamente significativa l'esposizione all'immunosoppressore primario sia a breve che lungo termine. In **figura 2** è riportato il risultato del "weaning" dell'immunosoppressore

primario nei 20/30 pazienti nei quali è stato possibile effettuarlo: di questi, 10 sono stati portati stabilmente ad una sola dose giornaliera, e 6 ad una dose ogni due giorni; di 4 pazienti portati fino a 3 sole dosi a settimana, 3 hanno manifestato un rigetto istologicamente confermato, di tipo lieve, e dopo il trattamento con lo steroide (vd. sopra), 2 sono stati riportati gradualmente ad un solo dosaggio/die, mentre l'ultimo ad un dosaggio ogni due giorni.

Per quanto riguarda la recidiva HCV post-trapianto, un incremento di AST e ALT correlato ad essa si è verificato in 25/30 (83,3%) pazienti del gruppo Thymo, e in 37/42 (88%) di pazienti del gruppo convenzionale ( $p=NS$ ); i valori medi dell'incremento di AST e ALT sono stati statisticamente più elevati nel gruppo Thymo (vd. **tabella 3**), ed inoltre l'intervallo di tempo medio al picco di AST ed ALT è stato statisticamente più precoce, dimostrando apparentemente che, nel gruppo Thymo, la comparsa della recidiva clinica avveniva più precocemente e con maggior intensità della citolisi epatica. La determinazione dell'HCVRNA quantitativa, al momento della recidiva clinica, dimostrava valori di  $23.3\pm 17.7$  Meq/mL per il gruppo Thymo, e di  $28.5\pm 25.4$  Meq/mL per l'altro gruppo ( $p < 0,02$ ); una conferma della maggior replicazione virale del gruppo convenzionale si otteneva anche ai mesi 3 e 6 dal trapianto, di nuovo con differenze statisticamente significative. La conferma istologica della recidiva HCV è stata ottenuta in tutti i pazienti con transaminasi alterate e HCVRNA quantitativa positiva; al momento del primo riscontro della recidiva, il grading medio sec. Ishak per il gruppo Thymo era di  $6,2\pm 3,6$  vs  $5,9\pm 4,3$  ( $p=NS$ ), mentre lo staging risultava  $1,5\pm 1,8$  vs  $2,1\pm 3,3$  ( $p=NS$ ). L'intervallo di tempo libero da malattia istologica risultava statisticamente più corto nel gruppo Thymo ( $97\pm 104$  giorni vs  $146\pm 128$  giorni,  $p < 0,03$ ). Tutti i 25 pazienti del gruppo Thymo con recidiva (18/25, 72% genotipo 1b) hanno iniziato il trattamento antivirale con PegInf alfa2b e ribavirina; di questi, 5 hanno dovuto interrompere il trattamento per gravi effetti collaterali, nonostante la riduzione della dose (2 per peggioramento degli indici di funzione epatica e transaminasi, 3 per mielodepressione-anemizzazione), gli altri 20 hanno concluso 6+6 mesi di

trattamento. Tutti i 20/25 (80%) pazienti trattati hanno riportato una risposta virologica positiva (riduzione di  $\pm 2$  log) già al termine dei primi sei mesi, confermata al termine dei 12 mesi in 15/25 (**60% ETR**). A sei mesi dalla sospensione del trattamento, 7/25 (5 genotipo non-1b) confermavano la negativizzazione dell'HCVRNA (**SVR 28%**), mentre in 13/25 la replicazione virale persisteva, sebbene spesso a valori moderati ( $8.9 \pm 11.5$  Meq/mL). Nei 5/30 pazienti del gruppo Thymo senza elevazione delle transaminasi, e pertanto NON biopsiati, l'HCVRNA quantitativo risultava sempre positivo, ma con valori modesti ( $4.8 \pm 2.2$  Meq/mL). Dei 5 pazienti che hanno dovuto interrompere il trattamento per gravi effetti collaterali, 1 (genotipo 1b) ha riportato una recidiva colestatica di HCV, con decesso in 477 giornata p.o.

Dei 37/42 pazienti non-Thymo (30/37, 81% genotipo 1b) con recidiva clinica e biopsia positiva, 30 hanno iniziato il trattamento antivirale con PegInf alfa2b e ribavirina, e di questi 25/30 hanno concluso 6+6 mesi di trattamento, mentre 5 hanno dovuto interrompere il trattamento per gravi effetti collaterali, nonostante la riduzione della dose (3 per granulocitopenia non responsiva alle GCSF, 2 per anemizzazione grave con necessità di trasfusioni). 17/25 (68%) pazienti hanno riportato una risposta virologica positiva (riduzione di  $\pm 2$  log) al termine dei primi sei mesi, confermata al termine dei 12 mesi in 10/25 (**40% ETR**). A sei mesi dalla sospensione del trattamento, solo 5/25 (3 genotipo non-1b) confermavano la negativizzazione dell'HCVRNA (**SVR 20%**), mentre nei restanti 20/25 la replicazione virale persisteva su valori elevati ( $21.3 \pm 11.5$  Meq/mL) a fronte di una citolisi cronica contenuta. Anche nei 7 pazienti che non avevano mai iniziato il trattamento antivirale, e nei 5 che lo avevano dovuto interrompere si assisteva allo stesso fenomeno di elevata replicazione virale ( $18.7 \pm 15.6$  Meq/mL) con citolisi contenuta entro max i valori normali  $\times 2$ .

Per quanto riguarda l'influenza del trattamento antivirale sulla istologia post-recidiva, entro i primi sei mesi di trattamento si assisteva complessivamente nei due gruppi ad una parziale regressione della flogosi, con miglioramento del

grading (Thymo grading 6M  $2,8\pm1,4$  vs  $3,6\pm3,3$ ;  $p=NS$ ) ma non dello staging della fibrosi (Thymo staging 6M  $1,9\pm1,8$  vs  $2,4\pm2,9$  ( $p=NS$ ); tale comportamento nei due gruppi non cambiava al termine di 12 mesi e dopo la sospensione di 6 mesi dal trattamento.

Stratificando la risposta istologica sulla risposta virologica, si verificava tuttavia che, mentre i pazienti con SVR nei due gruppi (7 Thymo vs 5 non-Thymo) non mostravano differenze significative nel grading e staging (rispettivamente Thymo SVR grading  $2,1\pm1,3$  vs  $2,6\pm3,0$ ;  $p=NS$ ; Thymo SVR staging  $2,9\pm2,8$  vs  $3,4\pm3,6$ ;  $p=NS$ ), i pazienti con *relapse* virologico (fallimento del trattamento antivirale, Thymo 18/30 vs non-Thymo 25/30) del gruppo non-Thymo mostravano grading e staging peggiori (rispettivamente Thymo fail grading  $4,7\pm3,9$  vs  $8,6\pm5,1$ ;  $p<0,05$ ; Thymo fail staging  $2,3\pm2,8$  vs  $5,4\pm4,9$ ;  $p<0,02$ ).

Per quanto riguarda l'influenza del diverso regime immunosoppressivo sul sistema immune dell'ospite, il pre-trattamento con thymoglobuline ha determinato un significativo calo del numero di leucociti e linfociti, rispetto ai pazienti dell'altro gruppo, complessivamente a tutti gli intervalli di tempo esaminati (WBC: Thymo  $2542\pm1749$  vs non-Thymo  $6826\pm8223$  cellule/ $\mu$ L,  $p<0,02$ ; linfociti: Thymo  $527\pm286$  vs non-Thymo  $1039\pm633$  cellule/ $\mu$ L,  $p<0,001$ ). Il trattamento antivirale con PegInf alfa2B, sebbene provocasse in quasi tutti i pazienti un peggioramento del numero di WBC e linfociti periferici, non determinava differenze significative fra i due gruppi. Il numero di CD4 e CD8 è stato valutato, nei pazienti del gruppo Thymo, a diversi intervalli di tempo (al trapianto, giorno 7, 30, inizio della terapia antivirale, dopo 6 e 12 mesi e dopo 6 mesi di sospensione del trattamento, vd. **figura 3**): dopo una iniziale, rapida diminuzione complessiva, la dinamica di ricostituzione del pool mostrava nel tempo un parziale ripristino, ma con una netta inversione del rapporto CD4/CD8 a favore di questi ultimi (rispettivamente CD4/CD8 giorno 0, ratio 3.18; 1 anno, ratio 0.87; 2 anni, ratio 1,56). Il trattamento antivirale determinava un'ulteriore lieve diminuzione del numero di CD4 e CD8, che veniva

recuperata alla fine del trattamento, mentre non aveva effetto sulla inversione del rapporto CD4/CD8, che rimaneva costante per tutto il follow-up.

### **Discussione.**

Scopo del presente studio, iniziato nel 2002 presso il Centro Trapianti di Fegato e Multiviscerale dell'Università di Modena, e conclusosi nel 2004 presso il Centro Trapianti di Fegato e Multiorgano dell'Università di Bologna, era di indagare l'influenza sulla severità della recidiva HCV post-trapianto e sopravvivenza a lungo termine, di un regime di induzione della tolleranza realizzato per mezzo di pre-trattamento del ricevente con anticorpi policlonali anti-timociti (Thymoglobuline) e minimizzazione della immunosoppressione postoperatoria basata su una monoterapia con Tacrolimus; è stata inoltre valutata l'influenza di tale regime anche ai fini della efficacia, in termini di risposta virologica ed istologica della terapia antivirale contro la reinfezione da HCV nei pazienti nei quali sussisteva indicazione al trattamento. I risultati preliminari di questa esperienza<sup>75</sup> avevano già dimostrato che l'applicazione di un regime di "prope-tolerance" nei pazienti HCV permetteva la diminuzione efficace dei livelli di immunosoppressione, senza aumentare l'incidenza di rigetto, e questo a sua volta comportava la riduzione della replicazione virale extraepatica, probabilmente in relazione ad una risposta più vigorosa della immunità cellulare dell'ospite nei confronti del virus; nel breve termine, non era possibile evidenziare fra i due gruppi differenze importanti in termini di sopravvivenza, di malattia istologica e di eventuale risposta alla terapia antivirale.

I risultati finali di questo studio, in due gruppi di pazienti HCV dalle caratteristiche omogenee, hanno dimostrato che l'induzione della tolleranza con Thymoglobuline non provoca differenze significative in termini di sopravvivenza, sia complessiva che da recidiva di HCV, nell'arco di follow-up considerato. Tuttavia, l'induzione con Thymoglobuline ha consentito di diminuire in maniera statisticamente

significativa l'esposizione all'immunosoppressore primario sia a breve che lungo termine, con una incidenza complessiva di rigetto acuto comparabile nei due gruppi, ma con una protezione maggiore verso fenomeni di rigetto clinicamente più gravi, peraltro ottenuta a livelli di immunosoppressore primario comparabilmente più bassi, se si considera che 20 su 30 pazienti HCV con induzione sono anche stati sottoposti gradualmente a "weaning", con il raggiungimento dello stato di "prope-tolerance" in 8/20 pazienti (frequenza somministrazioni < 1 volta/die). Sebbene l'incidenza di recidiva HCV post-trapianto sia risultata comprensibilmente comparabile nei due gruppi, tuttavia i più bassi livelli di immunosoppressione permessi dall'induzione con Thymoglobuline hanno sicuramente consentito un miglior "engagement" immunologico nei confronti del virus, ed infatti i livelli di replicazione virale sono sempre risultati statisticamente inferiori nel gruppo Thymo, sia al momento della "comparsa" di recidiva, che durante la terapia antivirale e al termine di essa. L'induzione con Thymoglobuline non si è dimostrata in grado di influenzare l'efficacia complessiva della terapia antivirale con peg-IFN alfa 2b e ribavirina (risposte ETR e SVR statisticamente comparabili) nella maggior parte dei pazienti, indipendentemente dal genotipo coinvolto, tuttavia è da segnalare di nuovo una replicazione virale inferiore anche nei pazienti Thymo non trattati rispetto ai pazienti dell'altro gruppo. Tra i pazienti che hanno dovuto sospendere il trattamento antivirale per gli effetti collaterali, va segnalato un decesso per recidiva colestatica di HCV (genotipo 1b) in un paziente Thymo a poco più di un anno dal trapianto, mentre nei 5 pazienti dell'altro gruppo, la sospensione provocava un picco di rimbalzo di viremia, che si attestava a livelli statisticamente elevati, senza tuttavia influire negativamente sulla funzione epatica. Nel gruppo Thymo, la combinazione di induzione e terapia antivirale efficace (pazienti con SVR dopo sei mesi dalla sospensione) non determinava effetti statisticamente rilevanti sulla risposta istologica al trattamento rispetto al gruppo con immunosoppressione convenzionale; al contrario, nei pazienti con *relapse* virologico durante o al termine

del trattamento, l'induzione con thymoglobuline determinava una viremia inferiore ed anche una istologia migliore, sia in termini di grading che di staging, rispetto al gruppo convenzionale, confermando ulteriormente la relazione fra bassa immunosoppressione, minore replicazione virale, minor danno istologico. E' da notare fra l'altro che nel gruppo di pazienti convenzionali con *relapse* si sono verificati due decessi per insufficienza epatica terminale post-recidiva HCV a 1006 e 1508 giorni post-trapianto. Infine, anche in questo studio la caratteristica ripopolazione linfocitaria dopo trattamento depletivo con Thymoglobuline è stata contraddistinta dal rilievo di un'inversione del rapporto CD4/CD8, che si è mantenuto costante nel tempo e sul quale non influiva l'intervento di un farmaco immunomodulante come l'IFN alfa 2b; il maggior aumento nel tempo della popolazione di linfociti T citotossici rispetto agli helper potrebbe spiegare l'influenza positiva delle thymoglobuline sui livelli di replicazione virale, ed un decorso della recidiva tendenzialmente più favorevole, come già peraltro osservato anche in altre esperienze<sup>76</sup>.

I limiti di questa esperienza risiedono principalmente nella esiguità del numero di pazienti e durata del follow-up, che tuttavia non hanno impedito di vedersi "affacciare" alcune differenze importanti in termini di viremia ed istologia; ancora, la mancanza di biopsie protocollari (cioè ad intervalli fissi, indipendentemente dal laboratorio) ha impedito di verificare cosa effettivamente accadeva, a livello istologico nei pazienti con transaminasi normali e viremia positiva. Infine non è stato possibile valutare l'influenza sull'incidenza, in termini di complicanze tossicologiche, infettivologiche e metaboliche secondarie alla diversa immunosoppressione nei due gruppi, per la frammentarietà dei dati raccolti.

Tuttavia, questa esperienza ha il merito di aver confermato che la induzione della tolleranza con agenti linfodepletivi quali le thymoglobuline, nei pazienti con trapianto di fegato ed infezione da HCV, rappresenta un vantaggio certo in termini di riduzione all'esposizione cronica all'immunosoppressione, caratteristiche virologiche della recidiva e decorso della malattia istologica soprattutto nei pazienti

*non-responders* alla terapia antivirale, notoriamente i più difficili da gestire dal punto di vista clinico. E' da sottolineare che questa esperienza ha avuto luogo in un contesto "storico" contraddittorio sugli effetti dei regimi di induzione alla tolleranza con agenti linfo-depletivi nei pazienti con trapianto di fegato ed infezione HCV: mentre infatti Eason e coll. pubblicavano risultati incoraggianti in termini di progressione della malattia in pazienti trattati con induzione con Thymoglobuline e senza steroidi<sup>77</sup>, ma non sottoposti a "weaning" programmato del tacrolimus, Eghtesad e coll. del gruppo di Pittsburgh, che per primi avevano utilizzato questo schema di induzione con monoinfusione ad alte dosi di thymoglobuline, non solo definivano deleterio questo protocollo, ed il correlato "weaning", nei pazienti HCV, ma finivano quasi col raccomandare di applicare in questi pazienti il più convenzionale regime con tacrolimus e steroidi, poiché influenzerebbe meno sfavorevolmente l'outcome dopo recidiva<sup>78</sup>. In precedenza, un'altro autore dello stesso gruppo aveva riportato risultati ancora negativi in termini di recidiva HCV in pazienti sottoposti a pre-trattamento con Alemtuzumab (anticorpo monoclonale anti-CD52), un potente agente linfo-penizzante, e successivo weaning<sup>79</sup>; tuttavia, da una analisi attenta di quanto riportato in queste due esperienze, si può sicuramente affermare che la scelta di trattare i fenomeni di rigetto post-weaning con un trattamento *rescue* con somministrazioni aggiuntive di Alemtuzumab e aggiunta di altri farmaci antirigetto, nello stesso arco di tempo nel quale si verificava la recidiva HCV è assolutamente criticabile e ad essa va totalmente ascritto l'outcome drammaticamente negativo della recidiva HCV in quel centro trapianti.

In conclusione, lungi dallo stabilire un nuovo standard di trattamento immunosoppressivo nei pazienti HCV con trapianto di fegato, questo studio contribuisce a fornire nuove, efficaci e sicure armi nella ricerca della tolleranza clinica, anche se non chiarisce, se non superficialmente con l'inversione del rapporto CD4/CD8, i meccanismi immunologici alla base dei risultati di questo studio comparativo; in un'interessante studio pubblicato di recente, la maggior concentrazione nei linfociti periferici di un particolare tipo di cellule dendritiche,

dette plasmocitoidi o DC2, rispetto a quelle definiti monocitoidi o DC1 è stata messa in positiva correlazione con il prodursi di uno stato di tolleranza donore-specifica nei pazienti sottoposti a weaning dell'immunosoppressore per varie indicazioni<sup>80</sup>. La ricerca della relazione esistente fra induzione della tolleranza con thymoglobuline, weaning dell'immunosoppressore, outcome della recidiva di HCV e rapporto fra DC2 e DC1 costituirà sicuramente l'oggetto di un nostro prossimo studio.

## Bibliografia.

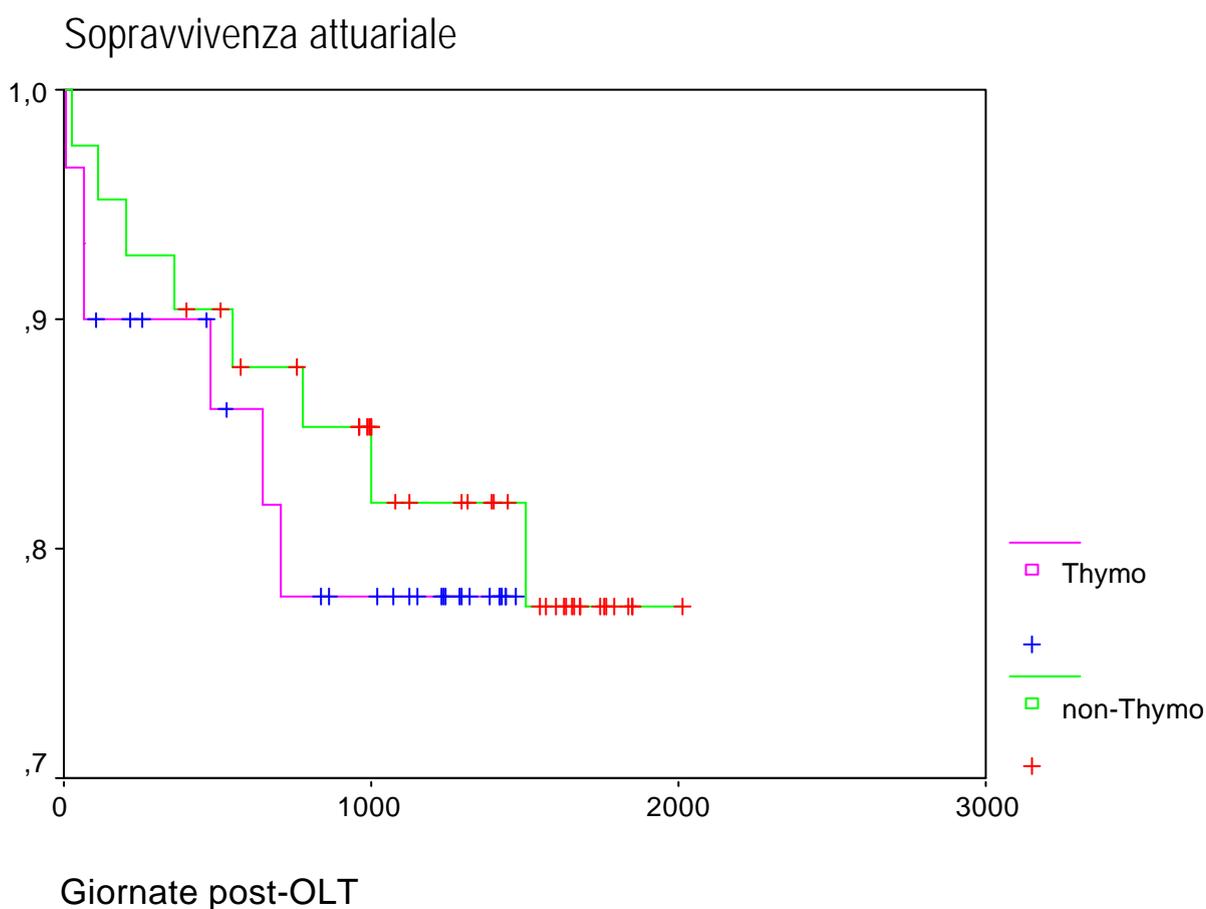
1. Gibson, T. & Medawar, P. B. (1943) *J. Anat.* **77**, 299–310.
2. Medawar, P. B. (1944) *J. Anat.* **78**, 176–199.
3. Billingham, R. E., Brent, L. & Medawar, P. B. (1953) *Nature* **172**, 603–606.
4. Billingham, R., Brent, L. & Medawar, P. (1956) *Philos. Trans. R. Soc. London B* **239**, 357–412.
5. Murray, J. E., Merrill, J. P., Dammin, G. J., et al. (1960) *Surgery* **48**, 272–284.
6. Starzl, T. E., Groth, C. G., Brettschneider, L., et al (1968) *Ann. Surg.* **168**, 392–415.
7. Barnard, C. N. (1968) *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **56**, 457–468.
8. Gatti, R. A., Meuwissen, H. J., Allen, H. D., et al (1968) *Lancet* **2**, 1366–1369.
9. Schwartz, R. & Dameshek, W. (1959) *Nature* **183**, 1682–1683.
10. Starzl, T. E., Marchioro, T. L., Porter, K. A., et al (1967) *Surg. Gynecol. Obstet.* **124**, 301–318.
11. Calne, R. Y., Rolles, K., White, D. J. G., et al (1979) *Lancet* **2**, 1033–1036.
12. Starzl, T. E., Todo, S., Fung, J., et al (1989) *Lancet* **2**, 1000–1004.
13. Owen RD (1945) *Science* 102: 400
14. Burnet FM, Fenner F (1949) The production of antibodies. Macmillian, Melbourne, 2<sup>nd</sup> edition
15. Burnet FM (1959) The clonal selection theory of acquired immunity. Cambridge University Press
16. Burnet FM (1969-1970) Self and not-Self. Melbourne University Press
17. Schwartz RH (1996) *J. Exp. Med.* 184: 1
18. Wells AD, Li CX, Li Y, Walsh MC, et al (1999). *Nat Med* 11: 1303
19. Stuart PM, et al. (1997). *J Clin Invest* 99: 396
20. Matzinger P (1999). *Nature Med* 5: 616
21. Denton MD, Magee CC, Sayegh MH (1999). *Lancet* 353: 1083
22. Sayegh MH, Turka L (1998). *N Engl J Med* 338:1813
23. Gribben JG, Guinan EC, Boussiotis VA, et al (1996). *Blood* 87:4887
24. Guinan EC, Boussiotis VA, Neuberger D, et al (1999). *N Engl J Med* 340:1704
25. Thomson A.W. and Lu L. *Transplantation* **68**: 1–8, 1999.
26. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S et al. *J Exp Med* **192**: 303–310, 2000.
27. Arpinati M, Chirumbolo G, Urbini B, et al. *Transpl. Immunol.* **11**: 345-356, 2003.
28. Groux H, O'Garra A, Bigler M, et al (1997). *Nature* 389:737
29. Zeng DF, Lewis D, Dejbakhsh-Jones S, et al (1999). *J Exp Med* 189:7:1073
30. Krenger W, Cooke KR, Crawford JM, et al (1996). *Transplantation* 15:1278.
31. Hong S, Van Kaer L (1999). *J Exp Med* 190:1197
32. Sonoda KH, Exley M, Snapper S, et al (1999). *J Exp Med* 190:1215
33. Rondelli D, Lemoli RM, Ratta M, et al (1999). *Blood* 94: 2293
34. Bal V, McIndoe A, Denton G, et al (1990). *Eur J Immunol* 20:1893
35. Marelli-Berg FM, Hargreaves REG, Carmichael P, et al (1996). *J Exp Med* 160: 3
36. Klyushnenkova EN, Shustova VI, Mosca JD, et al (1999). *Exp Hematol* 27: 325
37. Bartholomew A, Sturgeon C, Nelson M, et al (1999). *Exp Hematol* 27: 326
38. Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, et al. (1999). *Science* 283:1183
39. Bensinger WI, Clift R, Martin P, et al. (1996). *Blood* 88: 2794
40. Krenger W, Snyder KM, Byon CH, et al (1995). *J Immunol* 155:585
41. Pan L, Delmonte Jr J, Jalonen CK, et al (1995). *Blood* 86:4422
42. Mckenzie JL, Calder VL, Starling GC, et al (1995). *Bone Marrow Transplant* 15:163
43. Hartung T, Docke WD, Gantner F, et al (1995). *Blood* 85:2482.
44. Schwartz RS (1999). *N Engl J Med* 340: 1754
45. Wekerle T, Sykes M (1999). *Transplantation* 68: 459
46. Kashiwagi, N., Porter, K. A., Penn, et al (1969) *Surg. Forum* **20**, 374–376.
47. Calne, R. Y., Sells, R. A., Pena, et al (1969) *Nature* **223**, 472–474.

48. Kashiwagi, N. (1969) in *Experience in Hepatic Transplantation*, ed. Starzl, T. E. (Saunders, Philadelphia), pp. 394–407.
49. Ramsey, G., Nusbacher, J., Starzl, T. E. et al (1984) *N. Engl. J. Med.* **311**, 1167–1170.
50. Nemlander, A., Soots, A., von Willebrand, E., et al (1982) *J. Exp. Med.* **156**, 1087–1100.
51. Starzl TE, Demetris AJ, Murase N, et al. *Lancet* 1992; 339: 1579–1582.
52. Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, et al. *Hepatology* 1993; 17: 1127–1152
53. Storb R, Yu C, Wagner JL, et al (1997). *Blood* 89: 3048
54. Tsaroucha AK, Ricordi C, Noto TA, et al (1997). *Transplantation* 64: 362
55. Ricordi C; Karatzas T; Nery J, et al (1997). *Transplantation* 63: 7
56. Calne RY, Friend PJ, Moffatt S, et al. *Lancet* 1998; 351: 1701–1702.
57. Starzl TE PNAS 2004: 1-8
58. Starzl, TE, Murase, N., Abu-Elmagd, K., et al (2003) *Lancet* **361**, 1502–1510.
59. Mazariegos GV, Reyes J, Marino I, et al *Transplantation* 1997, 243-249
60. Shapiro, R., Jordan, M., Basu, A., et al; (2003) *Ann. Surg.* **238**, 520–525.
61. Golshayan D, Pascual M. 2006 *Transpl Int* : 881-884
62. Miller J, Mathew J, Esquenazi V. 2004 *Transplantation*, 67: 940-942
63. Kirk AD 2004 *Transplantation*, 67: 947
64. Berenguer M, Crippin J, Gish R et al 2003 *Hepatology*, 38: 34-41
65. Manez R et al. *Transplantation* 1995; 59:640-642
66. Gane EJ et al. *N Engl J Med* 1996; 334:815-8207
67. Vargas HE et al. *Liver Transpl Surg* 1997; 4:22-27
68. Asanza CG et al. *Hepatology* 1997; 26:755-763
69. Koziel MJ et al. *J. Virol* 1993;67:7522-7532
70. Missale G. et al. *Hepatology* 1993; 18:491-496
71. Napoli G. et a. *Hepatology* 1996; 24:759-765
72. Berenguer M, Ferrell L, Watson J, et al *J Hepatol* 2000; 32:673-684.
73. Berenguer M *Liver Transpl* 2002; 8:889-891
74. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, et al. *J Hepatol* 1995; 22: 696
75. De Ruvo N, Cucchetti A, Lauro A, et al. *Transplantation* 2005; 80: 8-12
76. Mc Caughan G, Zekry A. *Liver Transpl* 2003; 9: 21.
77. Nair S, Loss GE, Cohen AJ et al 2006 *Transplantation* 81: 620-622
78. Eghtesad B, Fung J, Demetris A et al *Liver Transpl* 2005; 11:1343-1352
79. Marcos A, Eghtesad B, Fung J, et al 2004 *Transplantation* 78: 966-971
80. Mazariegos GV, Zahorchak AF, Reyes J et al *Am J Transpl* 2003; 3: 689-696

	Gruppo Thymo n= 30	Gruppo NON-Thymo n=42	P value
Età al trapianto (intervallo)	53,4 ± 10,9 (27-67)	51,1 ± 11,04 (28-66)	NS
Maschio/Femmina	17/13	26/16	NS
CAD-LT/LDLT	10/20	12/30	NS
MELD score	18,9 ± 4,3	19,7 ± 4,1	NS
Età donatore (intervallo)	55,7 ± 15,1 (22-74)	57,0 ± 14,2 (28-77)	NS
Genotipo 1b (%)	20/30 (66,6%)	33/42 (78,5%)	NS

**Tabella 1.** Confronto delle caratteristiche dei pazienti al trapianto.

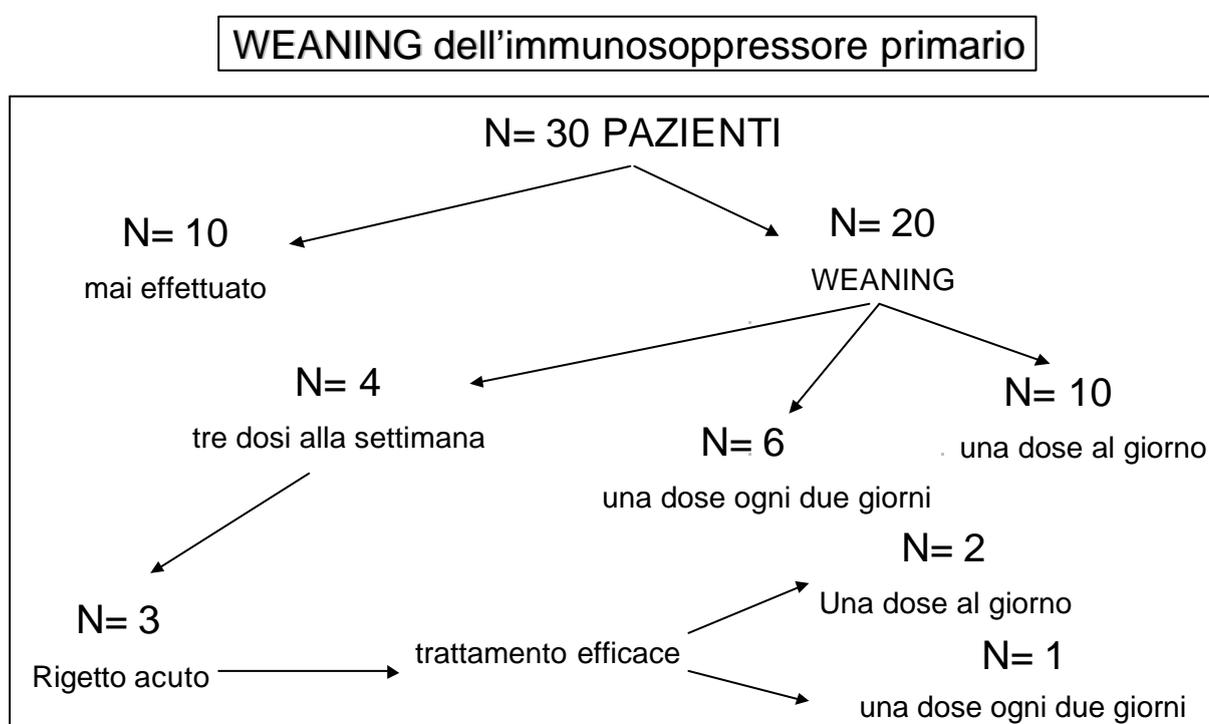
CAD-LT, cadaver liver transplant; LDLT, living donor liver transplant; MELD, model for end-stage liver disease



**Figura 1.** curva di sopravvivenza attuariale sec. Kaplan-Meier tra i due gruppi; il test Log-rank non ha dimostrato differenze statisticamente significative.

Variabile	THYMO	NON-THYMO	P
<b>dose Tacrolimus</b>			
Day 30	3,3 ± 1,8	6,7 ± 4,4	0,030
Day 90	2,4 ± 1,5	4,0 ± 2,2	0,004
Day 270	1,9 ± 1,3	3,1 ± 1,8	0,004
Day 365	1,3 ± 0,7	1,9 ± 1,2	0,001
Fine follow-up	0,9 ± 0,4	1,4 ± 0,7	0,014
<b>livello Tacrolimus</b>			
Day 30	7,9 ± 3,4	11,7 ± 4,2	0,003
Day 90	6,4 ± 2,8	8,7 ± 3,3	0,02
Day 270	4,3 ± 1,4	7,8 ± 3,7	0,001
Day 365	3,6 ± 1,1	6,4 ± 3,4	0,005
Fine follow-up	3,0 ± 0,9	4,9 ± 3,1	0,01

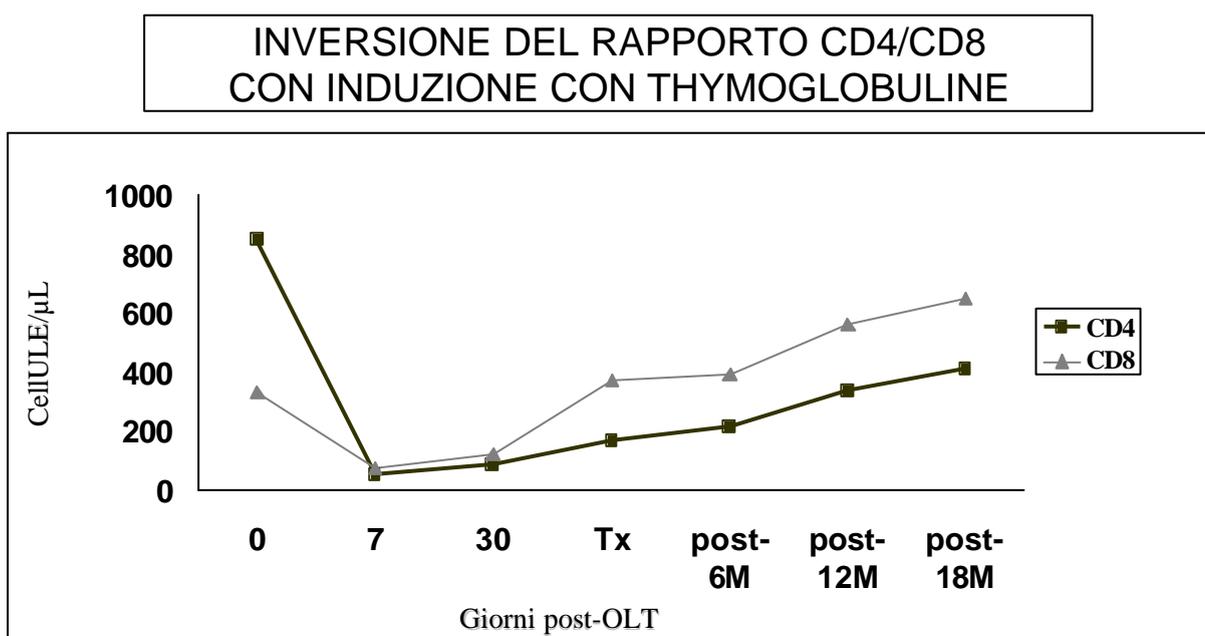
**Tabella 2.** Variabili di immunosoppressione nei due gruppi e risultati con significatività statistica.



**Figura 2.** Weaning del Tacrolimus in 30 pazienti HCV pre-trattati con Thymoglobuline, dosaggio corrente ed esito.

Variabile	THYMO	NON-THYMO	P value
Tasso Recidiva HCV (%)	25/30 (83,3%)	37/42 (88%)	NS
AST alla recidiva	167,8 ± 63,5 UI/mL	112,1 ± 49,7 UI/mL	0,006
ALT alla recidiva	227,6 ± 109,1 UI/mL	167,8 ± 72,4 UI/mL	0,03
Intervallo al picco di AST/ALT	69,9 ± 45 giorni	133,7 ± 66 giorni	0,04
HCV-RNA alla recidiva	23.3 ± 17.7 MEq/mL	28.5 ± 25.4 MEq/mL	0,02
HCV-RNA post- 3 mesi	22.8 ± 15.9 MEq/mL	34.5 ± 26.4 MEq/mL	0,01
HCV-RNA post- 6 mesi	15.4 ± 12.2 MEq/mL	22.3 ± 18.7 MEq/mL	0,02
ETR/SVR (%)	60/28	40/20	NS
HCV-RNA relapsers	8.9 ± 11.5 Meq/mL	21.3 ± 11.5 Meq/mL	0,004
<b>post-Tx antivirale</b>			
HCV-RNA pz. con Tx antivirale interrotta per eff. collaterali	13.4 ± 11.1 Meq/mL	18.7 ± 15.6 Meq/mL	0,04
HCV-RNA pz. senza Tx antivirale	4.8 ± 2.2 Meq/mL	11.8 ± 9.2 Meq/mL	0,001
Intervallo alla recidiva istologica	97 ± 104 giorni	146 ± 128 giorni	0,03
Grading Ishak in pz. relapsers	4,7 ± 3,9	8,6 ± 5,1	0,05
Staging Ishak in pz. relapsers	2,3 ± 2,8	5,4 ± 4,9	0,02

**Tabella 3.** Variabili di recidiva HCV nei due gruppi e risultati con significatività statistica



**Figura 3.** Rappresentazione della modulazione nel tempo della conta di CD4 e CD8 in 30 pazienti HCV pre-trattati con Thymoglobuline dal giorno del trapianto a sei mesi dopo la sospensione della terapia antivirale con peg-IFN alfa 2b e ribavirina